分光光度法测定白菜中亚硝酸盐的不确定度评定

郝晓莉[1]，赵瑛博[2,*]，陈芳芳[1]
(1.辽宁省农业科学院开放实验室，辽宁 沈阳 110161；2.沈阳农业大学分析测试中心，辽宁 沈阳 110866)

摘 要：通过对分光光度法测白菜中亚硝酸盐的含量测定过程的研究，确定测定结果的不确定度。建立不确定度的数学模型，对各不确定度分量进行合成和扩展，最终建立白菜中亚硝酸盐含量的不确定度评定方法。影响测量结果不确定度的因素共有4项，按其影响大小顺序排列分别为测量重复性、标准曲线法测定样液中亚硝酸酸盐质量、溶液定容以及试样称量。其不确定度报告为白菜中亚硝酸盐含量(12.3±1.08)mg/kg，包含因子k=2。

关键词：亚硝酸盐；不确定度；分光光度法

Evaluation of Uncertainty in Spectrophotometric Determination of Nitrite in Chinese Cabbage

HAO Xiao-li[1]，ZHAO Ying-bo[2,*]，CHEN Fang-fang[1]
(1. Open Laboratory of Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang 110161, China；
2. Analysis and Testing Center, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract：The sources of uncertainty in the spectrophotometric determination of nitrite in Chinese cabbage were investigated by analyzing whole determination procedure. Each uncertainty component was modeled, synthesized and developed a method for the evaluation of uncertainty in spectrophotometric determination of nitrite in Chinese cabbage. The uncertainty was attributed to four sources. The order of their impacts was measurement repeatability, nitrite mass determined by standard curve, sample dilution and sample weighting. The results of uncertainty evaluation showed the nitrite content to be (12.3 ± 1.08) mg/kg (k = 2).

Key words：nitrite；uncertainty；spectrophotometry
中图分类号：TS201.1 文献标志码：A 文章编号：1002-6630(2013)06-0208-03

测量不确定度是“与测量结果相关联的参数，表征合理的赋予被测量值的分散性”，它是被测量值在某一量值范围内的一个评定，是判定测量结果质量高低的依据[1-2]。本实验参照GB/T 5009.33—2008《食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定方法》[3]中第二法：分光光度法，以白菜为例，对食品中的亚硝酸盐的测定进行不确定度评定，建立分光光度法测定食品中亚硝酸盐的不确定度评定方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

白菜 市售。

亚铁氰化钾、硼酸钠、对氨基苯磺酸、盐酸萘乙二胺、亚硝酸钠(均为分析纯) 沈阳化学试剂三厂；亚硝酸钠标准储备液(200μg/mL)；水为二级水。

1.2 仪器与设备

电子天平(感量0.1mg)、TU-1901型分光光度计 北京普析通用仪器公司。

1.3 方法

1.3.1 测量原理

样品经沉淀蛋白质、去除脂肪，在弱酸条件下亚硝酸盐与对氨基苯磺酸重氮化后，与盐酸萘乙二胺偶合，形成紫红色染料，再与标准比较定量。

1.3.2 测定过程

称取样品，加入硼砂饱和溶液，定容后，置于沸水浴加热15min，冷却后加入亚铁氰化钾，摇匀后过滤，滤液上机测定。

1.3.3 工作曲线的绘制

亚硝酸钠标准溶液：准确称取0.010g亚硝酸钠，置于烧杯中，用水充分溶解后转移至100mL容量瓶中，加水稀释至刻度，制成质量浓度为100μg/mL的标准溶液。

分别取亚硝酸钠标准溶液0、2.5、5.0、7.5、10.0、12.5、15.0mL于50mL容量瓶中，再加入2mL对氨基苯磺酸溶液(4g/mL)、1mL盐酸萘乙二胺溶液(2g/mL)，加水定

收稿日期：2011-11-28
基金项目：辽宁省农产品质量安全检测与控制技术研究项目(2008403013)
作者简介：郝晓莉(1971—)，女，副研究员，硕士，研究方向为农产品质量安全与检测。E-mail：xiao-li-hao@163.com
*通信作者：赵瑛博(1979—)，女，讲师，硕士，研究方向为农产品质量安全。E-mail：yb_zhao1979@163.com

容至刻度。静置15min后，于538nm波长处测定吸光度，绘制工作曲线。

2 结果与分析

2.1 被测量的数学模型

根据测量原理及方法，测量结果可表示为以下函数关系：

$$X_i=\frac{A_i\times 1000}{m\times\frac{V_1}{V_0}\times 1000}$$

式中：X_i为试样中亚硝酸钠的含量/(mg/kg)；A_i为测定用样液中亚硝酸钠的质量/μg；m为试样质量/g；V_1为测定用样液体积/mL；V_0为试样处理液总体积/mL。

2.2 不确定度的来源

从测量过程和被测量的数学模型分析，白菜中亚硝酸盐含量测量的不确定度主要来源于测量用样液中亚硝酸钠的质量、试样质量、测定用样液体积、试样处理液总体积和重复性等因素，各相关不确定度如图1所示。其中测量用样液中亚硝酸钠质量的不确定度包括两个方面：一是标准曲线拟合的不确定度；二是配制标准溶液产生的不确定度，这其中又包括由标准物质引入的不确定度、称量产生的不确定度、标准溶液配制过程中量器校准产生的不确定度。

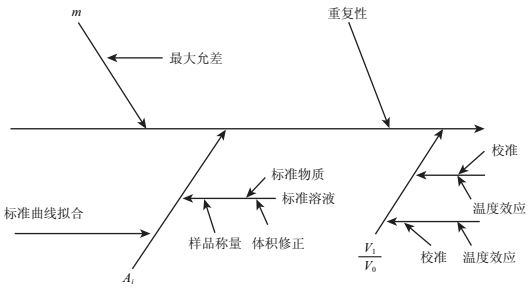


图1 不确定度的分量构成

Fig.1 Sources of uncertainty components

2.3 分析和量化不确定度分量

2.3.1 测量用样液中亚硝酸钠质量的不确定度

2.3.1.1 标准曲线拟合的不确定度

表1 标准曲线测定结果

Table 1 Standard curves of nitrite

质量浓度/(μg/mL)	吸光度		
	1	2	平均值
0.00	0.0007	0.0006	0.0006
5.00	0.1188	0.1202	0.1195
10.00	0.2360	0.2258	0.2309
15.00	0.3556	0.3566	0.3561
20.00	0.4688	0.4700	0.4694
25.00	0.5914	0.5903	0.5907
30.00	0.6948	0.6982	0.6965

标准曲线拟合的标准不确定度是通过对标准系列重复两次测量获得的。标准曲线的测量结果见表1。

根据表1结果，用最小二乘法拟合标准曲线，得回归方程y=0.0233x+0.0017，相关系数r=0.9998，其中设方程曲线斜率为B=0.0233，截距为A=0.0017，对样液中亚硝酸盐含量进行2次测定，结果分别为12.2、12.4μg/mL，平均值为12.3μg/mL。测定样液质量浓度C的标准不确定度由下式计算：

$$U_{(C)}=\frac{S}{B}\times\sqrt{\frac{1}{N}+\frac{1}{n}+\frac{\left(C_i-\bar{x}\right)^2}{\sum_{i=1}^{n}\left(x_i-\bar{x}\right)^2}}$$

其中，$S=\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\left[y_i-\left(Bx_i+A\right)\right]^2}{n-2}}=1.45\times10^{-2}$

式中：B为曲线斜率；n为校准点数，n=12；N为标准点测定次数，N=2；$\bar{x}$为所用校准溶液质量浓度的平均值；C_i为由标准曲线测得的样品的质量浓度值，C_i=12.3μg/mL，则：

$U_{(C)}$=0.577μg/mL，其相对标准不确定度为

$U_{\mathrm{rel}(C)}=\frac{U_{(C)}}{C}=\frac{0.577}{12.3}=0.0469$。

2.3.1.2 配制亚硝酸钠标准溶液产生的不确定度

分析纯亚硝酸钠的纯度在99.5%～100.5%之间，按矩形分布处理，其相对标准不确定度为

$$U_{1\mathrm{rel}}=\frac{U}{k}=\frac{0.5\%}{\sqrt{3}}=2.89\times10^{-3}。$$

2.3.1.3 称量产生的不确定度

配制标液时称样量为0.100g，天平检定书中给出的质量允许误差为δ=1.0mg，其置信水平99%，属正态分布，包含因子k=3，所以其标准不确定度$U_2=\frac{\delta}{k}=3.33\times10^{-4}$g，其相对标准不确定度为$U_{2\mathrm{rel}}=\frac{U_2}{m}=3.3\times10^{-3}$。

2.3.1.4 标准工作液配制过程中量器校准产生的不确定度评定

表2 配制标准工作曲线时量具引入的不确定度

Table 2 Uncertainty from volumetric flask and pipette readings during the preparation of standard curve

玻璃量具	最大允许差/mL	标准不确定度/mL	相对标准不确定度
100mL容量瓶	±0.10	0.0577	$U_1=5.77\times10^{-4}$
10mL移液管	±0.02	0.012	$U_2=1.2\times10^{-3}$
100mL容量瓶	±0.10	0.0577	$U_3=5.77\times10^{-4}$
25mL移液管	±0.04	0.023	$U_4=9.2\times10^{-4}$
50mL容量瓶	±0.02	0.0346	$U_5=6.92\times10^{-4}$

标准工作液配制过程中使用了一系列玻璃量具，按照JJG 196—2006《常用玻璃量具检定规程》[4]的要求，均有相应的最大允许差，满足矩形分布，$k=\sqrt{3}$，其相对不确定度如表2所示。

其合成标准不确定度

$U_{3\text{rel}}=\sqrt{U_1^2+U_2^2+U_3^2+U_4^2+U_5^2}=1.85\times10^{-3}$。

2.3.1.5 标准工作液制备不确定度的合成

由于标准物质、称量、量具校准的标准不确定度合成标准溶液制备的标准不确定度为

$U_{\text{rel(Std)}}=\sqrt{U_{1\text{rel}}^2+U_{2\text{rel}}^2+U_{3\text{rel}}^2}=\sqrt{0.00289^2+0.0033^2+0.00185^2}=4.76\times10^{-3}$。

2.3.1.6 测量用样液中亚硝酸钠质量的不确定度的合成

由标准工作溶液制备的不确定度与标准曲线拟合合成的测量用样液中亚硝酸钠质量的标准不确定度为

$U_{\text{rel}(A)}-\sqrt{U_{\text{rel(Std)}}^2+U_{\text{rel}(C)}^2}=\sqrt{0.00476^2+0.0469^2}=0.047$。

2.3.2 试样质量引入的不确定度

称量使用天平的最大允许误差为0.1mg，按照矩形分布，引入的标准不确定度为

$0.1\text{mg}\div\sqrt{3}=5.77\times10^{-2}\text{mg}$。

由于采用减量法称量，涉及两次独立的称量，所以样品称量的合成标准不确定度为

$U_{(m)}=\sqrt{2\times(5.77\times10^{-2})^2}=0.08\text{mg}$。

相对标准不确定度$U_{\text{rel}(m)}=\frac{U_m}{m}=\frac{0.08\text{mg}}{5\text{g}}=1.6\times10^{-5}$。

2.3.3 测定用样液体积引入的不确定度

样液总体积主要受到吸量管校准和温度效应的影响。

2.3.3.1 吸量管的校准

用于测定的样液体积为40mL，需要使用20mL吸量管移取两次。20℃时20mL吸量管的体积为(20±0.02)mL，按三角分布计算标准不确定度为$0.02/\sqrt{6}=8.2\times10^{-3}\text{mL}$，两次使用的合成标准不确定度为$U_{(V_1)}=\sqrt{2\times(8.2\times10^{-3})^2}=0.012\text{mL}$。

2.3.3.2 温度效应

水在20℃时的膨胀系数为2.1×10^{-4}/℃，假设温度变化范围为±4℃，近似矩形分布，40mL溶液产生的标准不确定度为$\frac{40\times2.1\times10^{-4}\times4}{\sqrt{3}}=1.9\times10^{-2}\text{mL}$。

吸量管校准与温度效应相互独立，将这两个分量合成，V_1的标准不确定度为

$U_{(V_1)}=\sqrt{0.012^2+0.019^2}=2.2\times10^{-2}\text{mL}$。

V_1的相对标准不确定度为

$U_{\text{rel}(V_1)}=\frac{U_{(V_1)}}{V1}=\frac{0.022}{40}=5.6\times10^{-4}$。

2.3.4 试样处理液总体积引入的不确定度

试样经提取后以水定容至500mL，该不确定度的分析与2.3.3节相同。

2.3.4.1 容量瓶的校准

20℃时500mL容量瓶的体积为(500±0.60)mL，按三角分布计算标准不确定度为$0.60/\sqrt{6}=2.4\times10^{-1}\text{mL}$。

2.3.4.2 温度效应

假设温度变化范围±4℃，水的膨胀系数为2.1×10^{-4}/℃，近似矩形分布，500mL溶液产生的标准不确定度为

$500\times2.1\times10^{-4}\times4/\sqrt{3}=0.24\text{mL}$。

校准与温度效应相互独立，将这两个分量合成，V_0的标准不确定度为

$U_{(V_0)}=\sqrt{0.24^2+0.24^2}=0.34\text{mL}$。

V_0的相对标准不确定度$U_{\text{rel}(V_0)}=\frac{U_{(V_0)}}{V_0}=6.8\times10^{-4}$。

2.3.5 由方法重复性引入的不确定度

用该标准方法进行5次独立测量，测量结果分别为1.23、1.16、1.21、1.26、1.23mg/kg，5次测量的平均值为1.22mg/kg。依据JJG 1059—1999《测量不确定度与表示》用极差法求得不确定度为

$(1.23-1.16)\div2.33=4.29\times10^{-2}\text{mg/kg}$

其相对标准不确定度 $U_{\text{rel(rep)}}=\frac{0.0429}{1.22}=3.52\times10^{-2}$。

2.4 合成标准不确定度

在整个测试过程中，不确定度来自于测量用样液中亚硝酸钠质量的不确定度、试样质量引入的不确定度、测定用样液体积引入的不确定度、试样处理液总体积引入的不确定度以及由方法重复性引入的不确定度。测定结果的不确定度应利用以上各分量的相对标准不确定度来进行合成。

$$U_{\text{rel}(X)}=\sqrt{U^2_{\text{rel}(A)}+U^2_{\text{rel}(m)}+U^2_{\text{rel}(V_1)}+U^2_{\text{rel}(V_0)}+U^2_{\text{rel(rep)}}}$$
$$=\sqrt{(0.047)^2+(1.6\times10^{-5})^2+(5.6\times10^{-4})^2+(6.8\times10^{-4})^2+(3.52\times10^{-2})^2}$$
$$=4.38\times10^{-2}$$

2.5 扩展不确定度

取包含因子$k=2$，扩展不确定度$U_{(X)}/X=2\times U_{\text{rel}(X)}=8.76\times10^{-2}$。则$U(x)=8.76\times10^{-2}\times12.3=1.08\text{mg/kg}$。

2.6 不确定度报告

白菜样品中亚硝酸盐含量为(12.3±1.08)mg/kg，$k=2$。

参考文献：

[1] 国家质量技术监督总局. JJF 1059—1999 测量不确定度评定与表示[S]. 北京: 中国计量出版社, 1999.

[2] 曹志军. 测试实验室中测量不确定度评定[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 2003.

[3] 国家质量技术监督检验检疫总局. GB/T 5009.33—2008 食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.

[4] 国家质量技术监督检验检疫总局. JJG 196—2006 常用玻璃量具鉴定规程[S]. 北京: 中国计量出版社, 2007.